自主食用不同甜味物质对小鼠尿液蛋白质组的影响

王海彤[1]，高友鹤[1]*

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室

北京 100875）

摘要

目的：探索自主食用甜味物质后小鼠尿液蛋白质组是否变化，以及不同甜味物质的变化是否不同。

方法：收集 C57BL/6l 小鼠主动食用甜味物质前后的尿液样品。甜味物质包括目前世界范围内应用较为广泛且能引起小鼠喜好反应的蔗糖、甜菊糖苷、安赛蜜、三氯蔗糖，其中非营养性甜味剂的浓度选择了已有研究显示的小鼠喜好反应最强烈的浓度。通过高效液相色谱串联质谱联用（LC-MS/MS）的非标记定量蛋白质组学技术进行分析，成组筛选尿液蛋白质组的差异蛋白，进行蛋白质功能和生物学过程分析；进行单只小鼠食用甜味物质前后尿液蛋白质组比较；并将不同甜味物质进行横向对比。

结果及结论：自主食用蔗糖和三氯蔗糖后尿液蛋白质组的差异蛋白富集到的生物学过程和糖、脂代谢和热的产生等相关；自主食用甜菊糖苷后尿液蛋白质组的差异蛋白富集的生物学过程主要与核小体组装、细胞分裂、染色质组成等相关；自主食用安赛蜜后尿液蛋白质组的差异蛋白富集到的生物学变化更多与细胞、体液免疫等相关；自主食用不同甜味物质前后尿液蛋白质组中均出现了与脑奖励回路相关的差异蛋白。结果表明，自主食用甜味物质前后小鼠的尿液蛋白质组发生了变化，且自主食用不同甜味物质后尿液蛋白质组的变化并不相同，在拓展尿液蛋白质组敏感性边界的同时还为探究各类食品添加剂对机体的潜在影响提供了一个新策略。

关键词：尿液蛋白质组 甜味物质 糖代谢 脑奖励通路

Effects of self-consumption of different sweet substances on urinary proteome of mice

Haitong Wang[1] Youhe Gao[1]*

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract

Objective: To explored whether the urinary proteome changed after self-consumption of sweet substances and whether the changes were different for different sweet substances..

Methods: Urine samples of C57BL/6l mice were collected before and after self-consumption of sweet substances, including sucrose, stevia glycosides, acesulfame and sucralose, which are widely used in the world and can cause the preference reaction of mice. Among them, the concentration of non-nutritive sweeteners was selected as the concentration that has been shown to have the strongest preference reaction of mice. Label-free quantitative proteomics using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for analysis. Differential proteins of urinary proteome were screened in groups for analysis of protein functions and biological pathways. The urinary proteome of single mice before and after self-consumption of sweet substances was compared, and the common differential proteins were counted; and the different sweet substances were compared horizontally.

Results and conclusions: The differential proteins in the urinary proteome after self-consumption of sucrose and sucralose were enriched in biological processes related to sugar and lipid metabolism and heat production. The differential proteins in the urinary proteome after self-consumption of stevia glycosides were mainly enriched in biological processes related to nucleosome assembly, cell division, and chromatin organization. The differential proteins in the urinary proteome after self-consumption of acesulfame were enriched in biological changes

---

基金项目：北京师范大学（11100704）

作者简介：1.王海彤.（2000.4—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。

通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

related to cellular and humoral immunity. Differential proteins related to the brain reward circuit were found in the urinary proteome both before and after the self-consumption of different sweet substances. The results showed that the urinary proteome of mice changed after self-consumption of sweet substances, and the changes were different for different sweet substances. This not only expanded the boundary of the sensitivity of the urinary proteome but also provided a new strategy for exploring the potential effects of various food additives on the body.
Keywords: urinary proteome; sweet substances; glucose metabolism; brain reward pathway

1 引言

糖是碳水化合物的一种，可以分为单糖：葡萄糖、果糖和半乳糖；双糖：蔗糖（Sucrose）、乳糖和麦芽糖[1]。糖直到近代才走向大多数人的饮食中，成为了寻常的调味品，糖能够提供大量的能量和令人愉快的甜味觉体验，但人类祖先是在低糖的环境下进化而来，很难在短时间内适应糖在饮食中的突然大量添加[2,3]。越来越多的研究表明，过量摄入糖会导致肥胖[4]、糖尿病[5]、心血管疾病[6]、非酒精性脂肪肝[7]、龋齿[8]和某些癌症[9]的风险增加；同时由于人类对甜味先天的敏感，导致不能短时间适应高浓度的甜味刺激，过量摄入糖，会在脑中产生超越正常的脑奖励信号，可能覆盖自我控制机制，导致成瘾，强烈的甜味觉刺激可以超过可卡因刺激的奖励[2] [3]。

越来越多的人意识到摄入过量糖的风险，而非营养性甜味剂作为糖的替代品，以其不含或低热量，且能提供更强烈的甜味觉体验而越来越受欢迎，广泛用于食品和饮料等产品的生产中[10]。目前世界范围内应用较为广泛的非营养性甜味剂主要包括阿斯巴甜、安赛蜜（Acesulfame）、三氯蔗糖（Sucralose）、甜菊糖苷（Stevia Glycosides）等[11] [12]。但是对于非营养性甜味剂的安全性和有效性一直存在争议。一项为期 11 年的研究表明，每天饮用 2 份及以上含非营养性甜味剂的饮料会增加患慢性肾病的风险[13]。非营养性甜味剂饮料的摄入会增加患白血病的风险，每天每增加一份摄入，风险增加 15%[14]。在一项对 17 名被试者的研究中，摄入三氯蔗糖相对于摄入水后的糖耐量实验中，血浆葡萄糖峰值浓度增加、胰岛素分泌率增加 20%[15]。

尿液是血液经肾脏过滤所产生，不受内环境稳态调节机制的控制，能更敏感地保留机体产生的各种微小变化而不被“缓冲”[16]。已有研究提出，通过尿液代谢组寻找生物标志物用于评估非营养性甜味剂的客观摄入，从而加强基于人群的研究[17]。尚未有研究分析食用不同甜味物质后尿液蛋白质组的变化。本研究选择目前世界范围内应用较为广泛且能引起小鼠喜好反映的甜味物质：蔗糖、甜菊糖苷、安赛蜜、三氯蔗糖，其中非营养性甜味剂浓度均选择了已有研究显示的小鼠喜好反应最强烈的浓度（0.3%甜菊糖苷、10 mM 安赛蜜、10 mM 三氯蔗糖）[18] [19]，通过收集小鼠自主食用不同的甜味物质后前的尿液样本，对尿液蛋白质组进行比较研究。探索自主食用糖和非营养性甜味剂尿液蛋白质组是否存在差异。技术路线如图 1 所示。

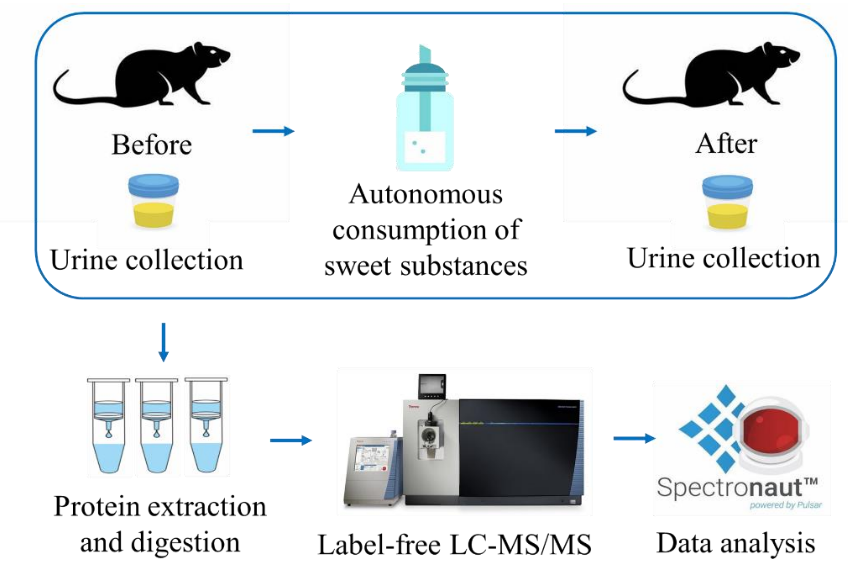


图 1 小鼠自主食用甜味物质尿液蛋白质组分析技术路线

2 实验方法

2.1 实验动物

10 周龄 C57BL/6l 雄性小鼠 9 只，购于北京维通利华实验动物生物技术有限公司。所有小鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）°C，湿度 65%-70%）。将所有小鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准，批准编号为 CLS-AWEC-B-2022-003。

2.2 尿液样本收集

本研究选择的甜味物质是目前世界范围内应用较为广泛且能引起小鼠喜好反映的蔗糖、甜菊糖苷、安赛蜜、三氯蔗糖，非营养性甜味剂浓度均选择了已有研究显示的小鼠喜好反应最强烈的浓度。

2.2.1 蔗糖组尿液样本收集

4 只雄鼠禁水 10 h 后，给水 1 h，禁水收尿 12 h，获得蔗糖对照组样本；雄鼠适应性喂养 2 天；雄鼠禁水 10 h 后，舔食 0.2 g 蔗糖粉末，给水 1 h，禁水收尿 12 h，获得蔗糖实验组样本，样本暂存于-80℃冰箱。

2.2.2 甜菊糖苷组尿液样本收集

5 只雄鼠禁水 10 h 后，给水收尿 12 h，获得甜菊糖苷对照组样本；雄鼠适应性喂养 1 天；雄鼠禁水 10 h 后，给 0.3%甜菊糖苷水收尿 12 h，获得甜菊糖苷实验组样本，样本暂存于-80℃冰箱。雄鼠适应性喂养 2 天。

2.2.3 安赛蜜组尿液样本收集

5 只雄鼠禁水 10 h 后，给水收尿 12 h，获得安赛蜜对照组样本；雄鼠适应性喂养 1 天；雄鼠禁水 10 h 后，给 10 mM 安赛蜜水收尿 12 h，获得安赛蜜实验组样本，样本暂存于-80℃冰箱。雄鼠适应性喂养 2 天。

2.2.4 三氯蔗糖组尿液样本收集

5 只雄鼠禁水 10 h 后，给水收尿 12 h，获得三氯蔗糖对照组样本；雄鼠适应性喂养 1 天；雄鼠禁水 10 h 后，给 10 mM 三氯蔗糖水收尿 12 h，获得三氯蔗糖实验组样本，样本暂存于-80℃冰箱。

2.3 尿液样本处理

尿蛋白提取：-80℃冰箱中取出小鼠尿液样本， 4°C 的条件下解冻。4℃，12000×g 离心 30 min，取 2 mL 上清液，每 500 μL 上清液于 2 mL 离心管中，加入三倍体积的预冷无水乙醇，上下颠倒轻柔混匀，-20°C 沉淀过夜蛋白。过夜沉淀的混合液 4°C，12000×g 离心 30 min，弃上清，等待乙醇挥发干燥。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L Tris)。 4°C，12000×g 离心 30 min，取上清于新的 1.5 mL 离心管内，获得尿液蛋白质。用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 μg 尿液蛋白质样品于 1.5 mL 离心管中，加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液使总体积为 200 μL。加入 20 mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀，金属浴 37°C 加热 1 h，冷却至室温。加入 50 mM 碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），涡旋混匀，室温避光反应 40 min。取 10 kDa 超滤管(Pall, Port Washington, NY, USA) 向滤膜上加入 200 μL UA 溶液 (8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)洗涤滤膜，18°C，14000×g 离心 5 min，弃去下层滤液，重复一次；向滤膜上加入碘乙酰胺处理完成后的尿液蛋白质样品，18℃，14000×g 离心 30 min，弃去下层滤液，尿液蛋白质留在滤膜上；向滤膜中加入 200 μL UA 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；向滤膜中加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；按胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶

（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行酶切，37°C 水浴 15 h。酶切结束后 4℃，13000×g 离心 30 min 收集滤液，该滤液为多肽混合液。将多肽混合液通过 HLB 固相萃取柱(Waters，Milford，MA)进行除盐，使用真空干燥仪冻干，于-20°C 条件下保存。

2. 4 LC-MS/MS 串联质谱分析

0.1%甲酸溶解多肽混合液冻干，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，用 0.1%甲酸将肽段浓度稀释为 0.5 μg/μL。从每个样品中取 6 μL 混匀，制备混合肽段样本。使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行混合肽段样本分离。离心收集 10 份流出液（Fractions），使用真空干燥仪冻干，用 0.1%甲酸复溶。10 份流出液和全部单个样品以样品 : iRT 体积比为 10 : 1 的例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。

10 份流出液分别取 1 μg 肽段，使用 EASY-nLC1200 高效液相色谱系统（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）进行洗脱分离。洗脱过程持续 90 min，流动相 B 的梯度为 4% - 90%（梯度条件：流动相 A 为 0.1%甲酸，流动相 B 为 80%乙腈；流速为 0.3 μL/min）。分离肽段采用 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）于数据依赖型采集（Data Dependent Acquisition, DDA）模式下进行质谱分析，生成 10 个 raw 文件。质谱数据以高灵敏度模式进行收集，在质荷比（m/z）范围为 350 - 1550 区间内获取完整的质谱扫描图，分辨率设定为 120,000。将 10 个 raw 文件导入 Proteome Discoverer（version 2.0, Thermo Scientific）中，利用 Swiss-iRT 和 Uniprot-Rat（2019 年 5 月）数据库进行搜库。根据搜库结果的 m/z 分布密度为单个样品的数据非依赖型采集（Data Independent Acquisition, DIA）模式设置可变窗口。

单个样品分别取 1 μg 肽段，于 DIA 模式下进行质谱分析，使用 EASY-nLC1200 高效液相色谱系统进行洗脱分离，分离肽段采用 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer 于 DIA 模式下进行质谱分析。质谱数据以高灵敏度模式进行收集，在 m/z 范围为 350 - 1500 区间内获取完整的质谱扫描图，分辨率设定为 60,000。生成 raw 文件,导入 Spectronaut Pulsa 软件进行分析。由 MS_2 中各片段离子的峰面积相加，计算肽段丰度，各肽段丰度相加计算蛋白质丰度。每个样本进行 3 次技术重复。

2.5 数据分析

每个样本进行 3 次技术重复，取平均值进行统计学分析。

本实验进行成组分析，将食用甜味物质后和食用甜味物质前进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或 ≤0. 67，双尾配对 t 检验分析的 P 值＜0.05。筛选到的差异蛋白通过 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）和 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/)分析。在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索脑奖励回路相关文献，总结参与脑奖励回路的相关蛋白，在成组分析的差异蛋白中检索已被报道的脑奖励回路相关蛋白。

同时本实验进行单只小鼠食用甜味剂后和食用甜味物质前的比较分析，筛选差异蛋白，差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥ 1.5 或 ≤ 0.67，双尾配对 t 检验分析的 P 值 ＜ 0.05；统计共有的共有差异蛋白。筛选到的共有差异蛋白通过 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）分析，并在单只小鼠尿液蛋白质组差异蛋白中检索已被报道的脑奖励回路相关蛋白。

3 实验结果与讨论

3.1 蔗糖组尿液蛋白质组的成组分析

3.1.1 差异蛋白功能分析

将蔗糖实验组与蔗糖对照组尿液蛋白质组进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67，P < 0.05。结果表明，蔗糖实验组与蔗糖对照组相比，尿液蛋白质组可以鉴定到 43 个差异蛋白，将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，结果如表 1 所示。

表 1 蔗糖实验组与蔗糖对照组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein name	Fold change	Trend	P value
P97798	Neogenin	∞	↑	4.29E-02
P45700	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	7.290	↑	1.78E-03
P26262	Plasma kallikrein	6.801	↑	1.99E-03
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	4.996	↑	4.92E-03
P28665	Murinoglobulin-1	4.719	↑	1.68E-02
P04940	Ig kappa chain V-VI region NQ2-17.4.1	4.272	↑	4.76E-02
O88322	Nidogen-2	2.985	↑	3.89E-03
E9PV24	Fibrinogen alpha chain	2.939	↑	3.28E-02
Q6RKD8	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1	2.752	↑	4.13E-02
Q61391	Enkephalinase	2.647	↑	3.61E-04
Q06770	Corticosteroid-binding globulin	2.444	↑	1.37E-02
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	2.368	↑	2.96E-02
Q921I1	Serotransferrin	2.240	↑	3.56E-02
Q61147	Ceruloplasmin	2.178	↑	1.37E-02
P00920	Carbonic anhydrase 2	2.160	↑	2.51E-02
Q8QZR4	Out at first protein homolog	2.022	↑	4.56E-03
P46412	Glutathione peroxidase 3	1.986	↑	1.30E-02
Q9QWR8	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1.920	↑	7.95E-03
P11352	Glutathione peroxidase 1	1.796	↑	9.05E-03
P06869	Urokinase-type plasminogen activator	1.776	↑	9.43E-04
P49183	Deoxyribonuclease-1	1.680	↑	4.92E-02
P13634	Carbonic anhydrase 1	1.646	↑	1.84E-02
Q920A5	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	1.638	↑	3.27E-02
P21614	Vitamin D-binding protein	1.632	↑	4.37E-03
Q80X71	Transmembrane protein 106B	1.530	↑	3.16E-02
P06797	Cathepsin L1	0.638	↓	9.67E-03
P57096	Prostate stem cell antigen	0.598	↓	1.93E-02
Q80YX1	Tenascin	0.596	↓	3.27E-02
P04939	Major urinary protein 3	0.573	↓	2.39E-02
P31786	Acyl-CoA-binding protein	0.548	↓	1.70E-02
P11152	Lipoprotein lipase	0.540	↓	6.49E-03
Q91V08	C-type lectin domain family 2 member D	0.523	↓	2.43E-02
P97426	Eosinophil cationic protein 1	0.523	↓	3.58E-03
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	0.468	↓	2.10E-02
A2BIM8	Major urinary protein 18	0.466	↓	1.23E-02
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	0.460	↓	3.34E-02
P05533	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1	0.458	↓	3.81E-02
P11591	Major urinary protein 5	0.445	↓	4.36E-02
P41272	CD27 antigen	0.384	↓	4.83E-02
Q9R0M4	Podocalyxin	0.268	↓	3.50E-03
A1L317	Keratin, type I cytoskeletal 24	0.266	↓	2.75E-02
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	0.256	↓	3.08E-02
O09131	Glutathione S-transferase omega-1	0.231	↓	1.57E-04

将鉴定到的差异蛋白经过 DAVID 数据库进行生物学过程和分子功能分析，结果如图 2 所示。

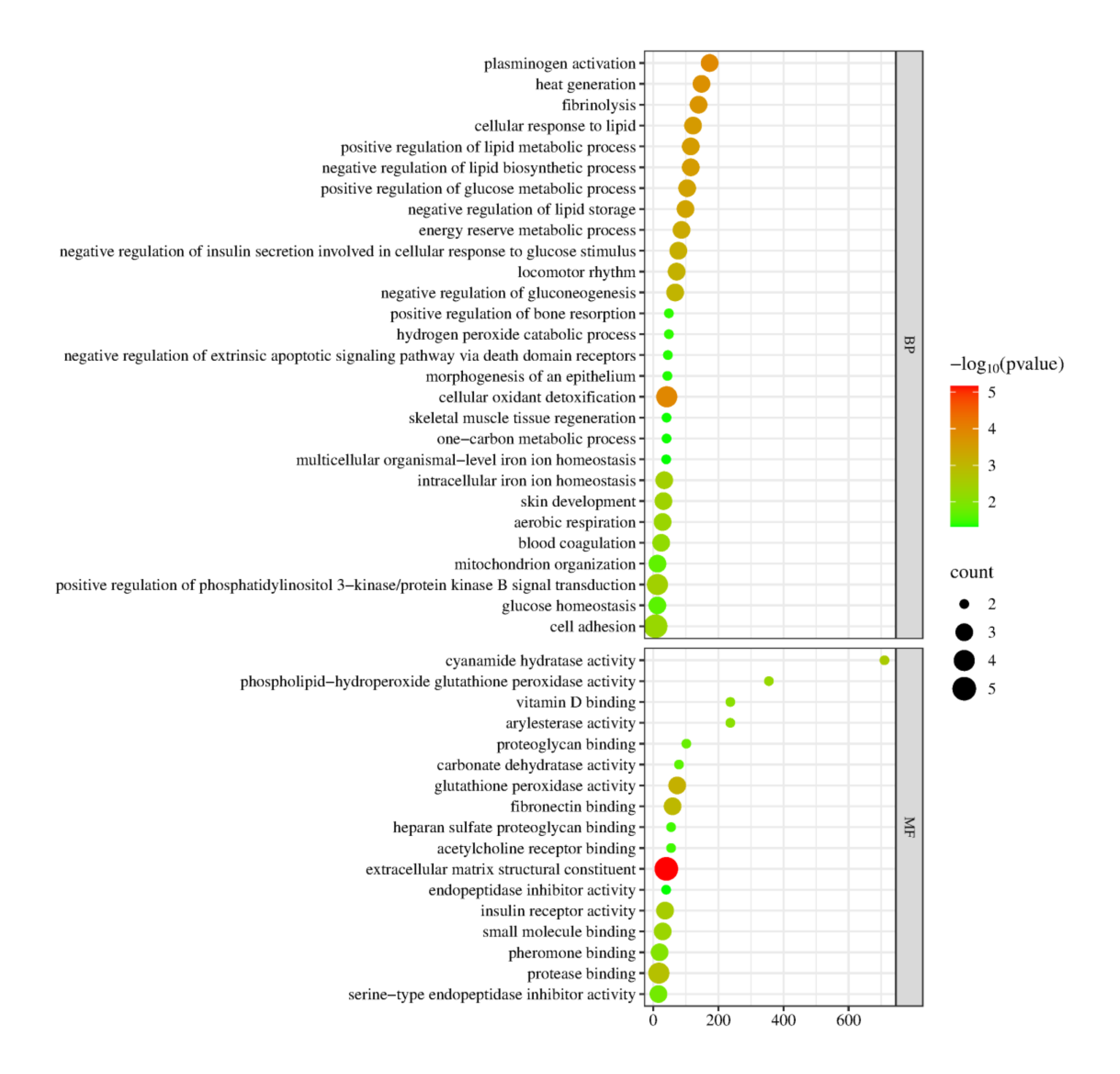


图 2 蔗糖组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白生物学过程和分子功能分析

其中有近一半的生物学过程显示的是糖、脂代谢和能量生产带来的变化，如：Heat generation、Cellular response to lipid、Positive regulation of lipid metabolic process、Negative regulation of lipid biosynthetic process、Positive regulation of glucose metabolic process、Negative regulation of lipid storage、Energy reserve metabolic process、Negative regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus 等；分子功能中显示出与 Insulin receptor activity 相关，此外也主要与细胞外基质结构组成、分子结合和各类酶活性的调节等相关，这很可能与食用蔗糖导致的代谢反应相关。

3.1.2 差异蛋白与脑奖励回路

为进一步探究尿液蛋白质组差异蛋白是否有脑奖励回路相关的蛋白，通过 Uniprot 检索蔗糖组差异蛋白的功能和涉及的生物学过程，寻找是否与已报道的脑奖励回路中的关键蛋白相关[20]，结果如

表 2 所示，小鼠自主食用蔗糖前后尿液蛋白质组差异蛋白中能够检索到和脑奖励回路

相关的蛋白。

表 2 蔗糖组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白与脑奖励回路

The Brain's Reward Circuitry	
Glutamate	√
Dopamine	
Gamma-aminobutyric acid / GABA	√
Substance P	√
Enkephalin	√

Podocalyxin 位于谷氨酸能突触前膜，参与到突触的组装过程。

Acyl-CoA-binding protein 能够取代神经官能症药物地西泮位于γ-氨基丁酸 A 型受体上的苯二氮卓的识别位点，能作为神经肽来调节γ-氨基丁酸受体的作用；参与到学习记忆、突触传递的正调控、神经胶质细胞增殖等生物学过程中。

Tenascin 位于谷氨酸能神经元中，在发育过程中引导神经元迁移和轴突导向、参与突触可塑性和神经元再生、在体外培养中能够促进神经元的神经突生长。

Procathepsin L 在神经内分泌嗜染色质细胞分泌囊泡中，催化激素原脑啡肽加工成活性脑啡肽神经递质；参与到脑啡肽的处理、神经发育等生物学过程中。

Carbonic anhydrase 2 参与到γ-氨基丁酸能突触传递的正调节等生物学过程中。

14-3-3 protein zeta/delta 在谷氨酸能突触等区域表达，参与到突触成熟的调控、突触目标的识别等生物学过程中。

Enkephalinase 具有裂解阿片肽，如：Met-enkephalin 和 Leu-enkephalin 的能力，还能催化缓激肽、Substance P 和神经紧张肽的裂解；参与到学习记忆、Substance P 分解代谢、神经发育的正调控等生物学过程中。

Neogenin 位于谷氨酸能突触、突触后膜中，参与到轴突再生的调节和跨突触信号转导，调节突触传递等生物学过程中。

3.2 蔗糖组个体尿液蛋白质组的前后分析

将单个小鼠食用蔗糖后的尿液蛋白质组与食用蔗糖前的尿液蛋白质组进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67，双尾 t 检验 $P < 0.05$，统计共有的差异蛋白，结果如图 3 所示。

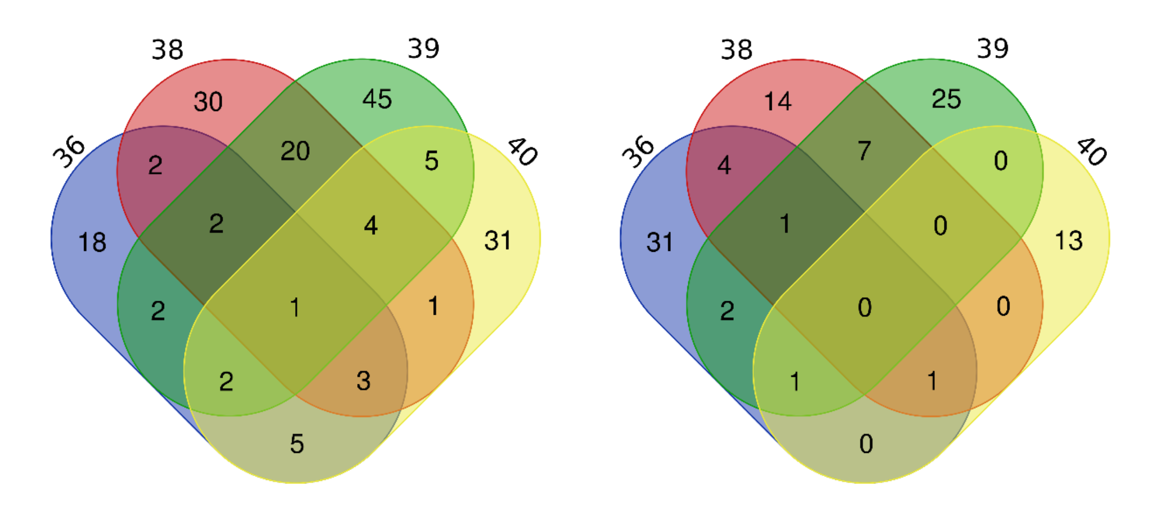


图 3 蔗糖组个体食用蔗糖后前共有上调差异蛋白（左）下调差异蛋白（右）

共有 1 个上调差异蛋白 Glutathione peroxidase 3。通过 Uniprot 检索发现该蛋白通过催化谷胱甘肽还原过氧化氢、脂质过氧化物和有机过氢，保护细胞和酶免受氧化损伤，主要参与过氧化氢分解代谢、对氧化应激的反应等生物学过程中。说明小鼠在自主食用蔗糖前后，其尿液蛋白质组中所出现的差异蛋白在不同个体之间存在一定程度的差异。

通过 Uniprot 检索单个小鼠自主食用蔗糖前后尿液蛋白质组的差异蛋白功能和参与的生物学过程，查找是否与脑奖励回路蛋白相关，如表 3 所示，单只小鼠自主食用蔗糖前后尿液蛋白质组的差异蛋白中均出现与脑奖励回路相关的蛋白，但种类和数量具有差异。

表 3 蔗糖组个体食用蔗糖后前尿液蛋白质组差异蛋白中与脑奖励回路相关的蛋白

	Glutamate	Dopamine	Gamma-aminobutyric acid GABA	Substance P	Enkephalin
36	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic Heat shock cognate 71 kDa protein Glutathione hydrolase 1 proenzyme Epidermal growth factor receptor				
38	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic Heat shock cognate 71 kDa protein Actin, cytoplasmic 1 Ephrin type-B receptor 2 Amyloid-beta precursor protein Syntenin-1 Actin, alpha cardiac muscle 1		Acyl-CoA-binding protein		
39	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic Heat shock cognate 71 kDa protein Actin, cytoplasmic 1 Aspartate aminotransferase, mitochondrial Profilin-1 Glypican-4 Neogenin Cadherin-11		Acyl-CoA-binding protein Cadherin-13 Carbonic anhydrase 2	Neprilysin	Neprilysin
40	Aspartate aminotransferase, mitochondrial Plasminogen Calbindin		Calbindin	Neprilysin	Neprilysin

3.3 甜菊糖苷组尿液蛋白质组的成组分析

3.3.1 差异蛋白功能分析

将甜菊糖苷实验组与甜菊糖苷对照组尿液蛋白质组进行比较，筛选差异蛋白条件为：$FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67，双尾 t 检验 $P < 0.05$。结果表明，甜菊糖苷实验组与甜菊糖苷对照组相比，尿液蛋白质组可以鉴定到 60 个差异蛋白，将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，结果如表 4 所示。

表 4 甜菊糖苷实验组与甜菊糖苷对照组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein name	Fold change	Trend	P value
Q8R0W0	Epiplakin	9.865	↑	2.25E-02
Q6PGG6	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein	5.833	↑	1.77E-02
Q60823	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	5.194	↑	2.85E-02
O54965	E3 ubiquitin-protein ligase RNF13	4.648	↑	3.83E-03
Q9D7R7	Gastricsin	3.323	↑	3.46E-02
Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1	2.702	↑	4.00E-02
P62715	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	2.673	↑	3.80E-02
Q9DAU7	WAP four-disulfide core domain protein 2	2.575	↑	2.79E-02
Q8K1H9	Odorant-binding protein 2a	2.574	↑	1.92E-02
Q9Z0M9	Interleukin-18-binding protein	2.570	↑	1.73E-02

P15501	Prostatic spermine-binding protein	2.552	↑	3.94E-05
Q6UGQ3	Secretoglobin family 2B member 2	2.510	↑	4.69E-02
Q8BWP8	Beta-1,4-glucuronyltransferase 1	2.444	↑	4.23E-02
P00687	Alpha-amylase 1	2.225	↑	1.37E-02
P51910	Apolipoprotein D	2.203	↑	2.96E-02
P11590	Major urinary protein 4	2.175	↑	4.32E-02
P18572	Basigin	2.147	↑	4.13E-02
P07361	Alpha-1-acid glycoprotein 2	2.005	↑	1.61E-02
P19221	Prothrombin	1.996	↑	4.79E-02
P03953	Complement factor D	1.927	↑	1.19E-02
P13597	Intercellular adhesion molecule 1	1.812	↑	6.28E-05
P02816	Prolactin-inducible protein homolog	1.751	↑	4.14E-02
Q03404	Trefoil factor 2	1.702	↑	1.05E-03
Q61398	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	1.690	↑	2.69E-03
Q61147	Ceruloplasmin	1.685	↑	4.09E-02
Q9R1E6	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	1.678	↑	4.73E-02
Q64726	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1.657	↑	1.43E-02
P18181	CD48 antigen	1.570	↑	2.63E-02
Q8CIF4	Biotinidase	1.566	↑	6.06E-03
Q8BZT5	Leucine-rich repeat-containing protein 19	1.527	↑	2.61E-02
P08905	Lysozyme C-2	0.657	↓	5.56E-03
P62737	Actin, aortic smooth muscle	0.644	↓	1.98E-02
Q5FW60	Major urinary protein 20	0.605	↓	3.90E-02
P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	0.583	↓	2.10E-02
Q921W8	Secreted and transmembrane protein 1A	0.571	↓	9.81E-03
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	0.513	↓	8.45E-03
P48441	Alpha-L-iduronidase	0.457	↓	4.21E-02
Q08761	Vitamin K-dependent protein S	0.450	↓	1.07E-02
Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	0.429	↓	1.56E-02
P51655	Glypican-4	0.387	↓	3.74E-02
P62806	Histone H4	0.378	↓	8.00E-03
P35505	Fumarylacetoacetase	0.370	↓	4.13E-02
Q01721	Growth arrest-specific protein 1	0.321	↓	6.50E-03
Q61088	Frizzled-4	0.297	↓	2.80E-02
Q3UMW8	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 homolog	0.274	↓	1.77E-02
Q7TSK7	ADAMTS-like protein 2	0.226	↓	7.79E-03
Q9ES90	G-protein coupled receptor 35	0.216	↓	1.94E-02
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0.197	↓	4.47E-02
P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	0.194	↓	3.53E-02
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	0.190	↓	1.96E-02
P70210	Transcriptional enhancer factor TEF-5	0.159	↓	3.03E-02
Q9DAS9	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	0.122	↓	4.91E-02
O35215	D-dopachrome decarboxylase	0.111	↓	7.45E-03
Q64105	Sepiapterin reductase	0.103	↓	2.37E-02
Q8BX35	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 27	0.091	↓	2.43E-02
Q8C110	SLIT and NTRK-like protein 6	0.060	↓	1.16E-02

O08709	Peroxiredoxin-6	0.023	↓	3.36E-02
P15949	Kallikrein 1-related peptidase b9	0.000	↓	6.21E-03
P07141	Macrophage colony-stimulating factor 1	0.000	↓	3.44E-02
P61458	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	0.000	↓	3.93E-02

将鉴定到的 60 个差异蛋白经过 DAVID 数据库进行生物学过程和分子功能分析，结果如图 4 所示。

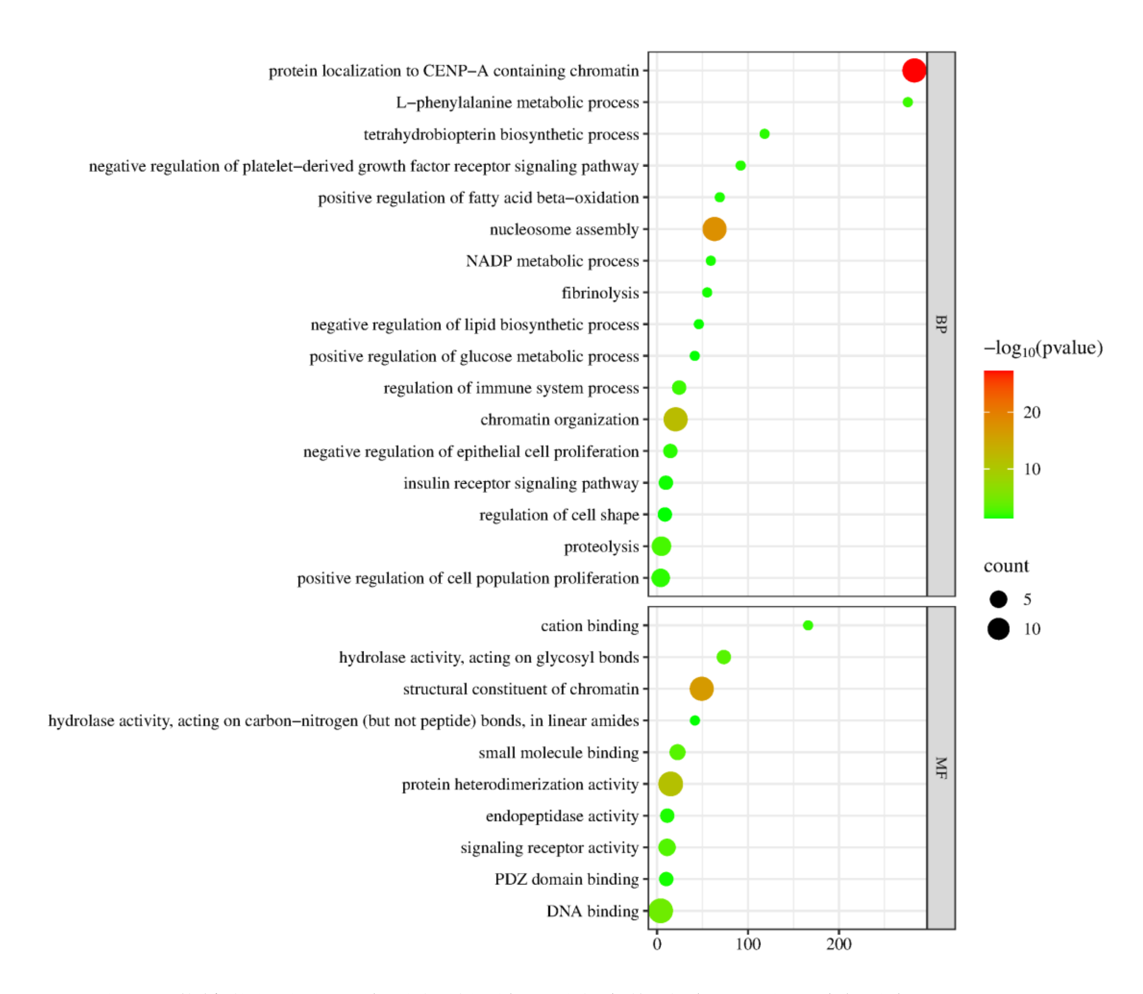


图 4 甜菊糖苷组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白生物学过程和分子功能分析

与蔗糖组和其它非营养性甜味剂组不同，甜菊糖苷组差异最为显著的生物学过程是与细胞分裂相关的变化，如：Protein localization to CENP-A containing chromatin、nucleosome assembly、chromatin organization 等，已有研究表明 CENP-A 过表达与哺乳动物细胞的癌症状态相关[21]。其次是能量代谢相关的生物学过程，如：Positive regulation of fatty acid beta-oxidation、NADP metabolic process、Negative regulation of lipid biosynthetic process、Positive regulation of glucose metabolic process、Insulin receptor signaling pathway。分子功能中变化最为显著的是 Structural constituent of chromatin、Protein heterodimerization activity、DNA binding 等，主要与 DNA 和蛋白质的活动相关，蔗糖组出现的与胰岛素相关分子功能在甜菊糖苷组未显示。

3.3.2 差异蛋白与脑奖励回路

通过 Uniprot 检索甜菊糖苷组差异蛋白的功能和涉及的生物学过程，寻找是否与已报道的脑奖励回路中的关键蛋白相关，结果如

表 5 所示，小鼠自主食用甜菊糖苷前后尿液蛋白质组差异蛋白中能够检索到和脑奖励回路相关的蛋白。

表 5 甜菊糖苷组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白与脑奖励回路

The Brain’s Reward Circuitry	
Glutamate	√
Dopamine	√
Gamma-aminobutyric acid / GABA	√
Substance P	
Enkephalin	

Sepiapterin reductase 参与到神经元分化过程中的细胞形态发生、多巴胺代谢等生物学过程中。

Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 具有多巴胺受体结合、γ-氨基丁酸跨膜转运等功能，参与到腺苷酸环化酶激活多巴胺受体信号通路、磷脂酶 c 激活多巴胺受体信号通路等生物学过程中。

Frizzled-4 在谷氨酸能突触中表达，参与到树突形态发生的正调控、神经元投射树化的正调控等生物学过程中。

Glypican-4 在谷氨酸能突触、突触前膜等位置表达，参与到神经递质受体定位对突触后特化膜的调节、突触前组装调控、突触膜黏附等生物学过程中。

Glutathione hydrolase 1 proenzyme 具有谷胱甘肽水解酶活性，参与谷胱甘肽的分解代谢、谷氨酸的代谢过程和对酒精的反应。

3.4 甜菊糖苷组个体尿液蛋白质组的前后分析

分别将单个小鼠食用甜菊糖苷后的尿液蛋白质组与食用甜菊糖苷前的尿液蛋白质组进行比较，筛选差异蛋白条件为：$FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67，双尾 t 检验 $P < 0.05$，统计共有的差异蛋白，结果如图 5 所示。

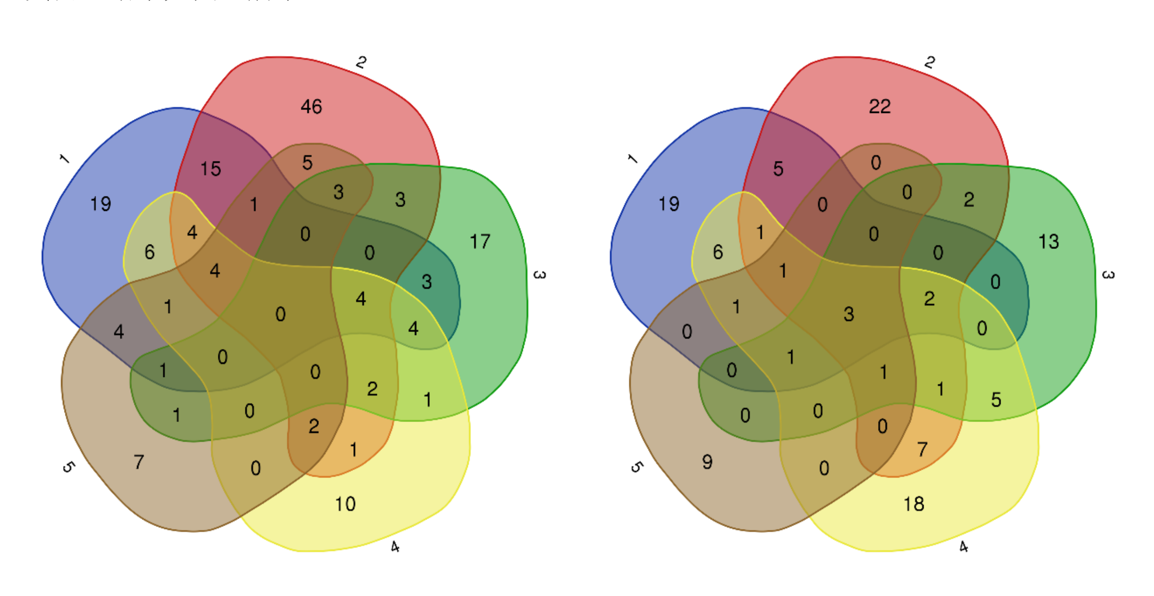


图 5 甜菊糖苷组个体食用甜菊糖苷后前共有上调差异蛋白（左）下调差异蛋白（右）

共有 3 个下调差异蛋白，分别为 2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase、Glutathione hydrolase 1 proenzyme 和 Ig kappa chain V-III region PC 2880/PC 1229。通过 Uniprot 检索蛋白的功能和涉及的生物学过程，2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase 具有催化正常代谢过程中形成的烯胺/亚胺中间体的水解脱胺、促进核糖核酸酶 P/MRP 复合体的募集来促进核糖核酸内裂解的功能，参与到脂质代谢、mRNA 分解、翻译负调控等生物学过程中；Glutathione hydrolase 1 proenzyme 能够裂解细胞外谷胱甘肽及其偶联物和其他γ-谷氨酰化合物的γ-谷氨酰键，参与谷胱甘肽代谢、谷氨酸的代谢、对脂多糖和酒精的反应等生物学过程中；而 Ig kappa chain V-III region PC 2880/PC 1229 则参与到机体适应性免疫应答。说明小鼠在自主食用甜菊糖苷前后，其尿液蛋白质组中所出现的差异蛋白在不同个体之间存在一定程度的差异。

通过 Uniprot 检索单个小鼠自主食用甜菊糖苷前后尿液蛋白质组的差异蛋白功能和参与的生物学过程，查找是否与脑奖励回路蛋白相关，如表 5 所示，单只小鼠自主食用甜菊糖苷前后尿液蛋白质组的差异蛋白中均出现与脑奖励回路相关的蛋白，但种类和数量具有差异。

表 6 甜菊糖苷组个体食用甜菊糖苷后前尿液蛋白质组差异蛋白与脑奖励回路相关的蛋白

	Glutamate	Dopamine	Gamma-aminobutyric acid GABA	Substance P	Enkephalin
1	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Glypican-4 Interleukin-1 receptor accessory protein Amino acid transporter heavy chain SLC3A2	Stromal cell-derived factor 1 Amino acid transporter heavy chain SLC3A2 Cadherin-1			
2	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Glypican-4 Frizzled-4 Cadherin-11 Interleukin-1 receptor accessory protein Amino acid transporter heavy chain SLC3A2 SPARC-like protein 1 Myc box-dependent-interacting protein 1 Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog Gamma-glutamyl hydrolase Heat shock cognate 71 kDa protein	Amino acid transporter heavy chain SLC3A2 Cadherin-1 Sepiapterin reductase	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog		
3	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Frizzled-4 Cadherin-11 Podocalyxin	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial			
4	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Glypican-4 Frizzled-4 Ornithine aminotransferase, mitochondrial Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial Ephrin type-B receptor 2	Stromal cell-derived factor 1 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial			
5	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Glypican-4 Frizzled-4 Cadherin-11				

3.5 安赛蜜组尿液蛋白质组的成组分析

3.5.1 差异蛋白功能分析

通过对安赛蜜实验组和安赛蜜对照组的尿液蛋白质组总蛋白进行非监督聚类分析即可对小鼠食用安赛蜜的前后进行区分，如图 6 所示。说明自主食用安赛蜜前后小鼠尿液蛋白质组的差异更明显。

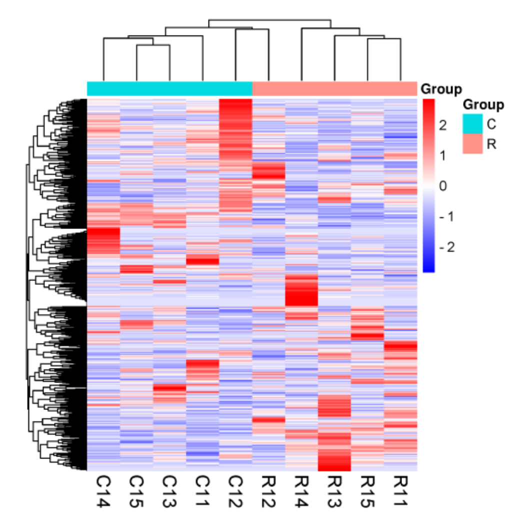


图 6 安赛蜜组总尿液蛋白质组非监督聚类

安赛蜜实验组与安赛蜜对照组尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67，双尾 t 检验 P < 0.05。结果表明，安赛蜜实验组与安赛蜜对照组相比，可以鉴定到 96 个差异蛋白，明显多于蔗糖组和其它非营养性甜味剂组，进一步说明自主食用安赛蜜前后小鼠尿液蛋白质组的差异更明显。将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，结果如表 7 所示。

表 7 安赛蜜实验组与安赛蜜对照组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein name	Fold change	Trend	P value
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	30.827	↑	3.78E-02
P51885	Lumican	25.221	↑	5.62E-03
Q9JM99	Proteoglycan 4	16.785	↑	3.01E-02
O54965	E3 ubiquitin-protein ligase RNF13	10.791	↑	4.54E-02
P09103	Protein disulfide-isomerase	7.170	↑	4.56E-02
Q60823	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	5.831	↑	4.34E-02
P31725	Protein S100-A9	5.531	↑	1.04E-02
P47878	Insulin-like growth factor-binding protein 3	5.261	↑	3.02E-02
Q61881	DNA replication licensing factor MCM7	4.971	↑	2.35E-02
Q811B3	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	4.609	↑	2.03E-02
Q9DAU7	WAP four-disulfide core domain protein 2	4.595	↑	1.10E-02
Q64729	TGF-beta receptor type-1	4.554	↑	2.09E-02
Q9R007	C-type lectin domain family 5 member A	4.389	↑	1.34E-04
P04441	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain	4.281	↑	3.33E-02
A1L317	Keratin, type I cytoskeletal 24	3.766	↑	1.59E-03
P35461	Lymphocyte antigen 6G (Fragment)	3.746	↑	1.91E-02
Q9CRD2	ER membrane protein complex subunit 2	3.166	↑	4.63E-02
Q08423	Trefoil factor 1	3.154	↑	2.76E-02
Q61495	Desmoglein-1-alpha	2.941	↑	8.20E-03
P57096	Prostate stem cell antigen	2.688	↑	1.76E-02
Q64281	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4	2.501	↑	4.96E-02
P48614	Protein Wnt-10b	2.290	↑	2.39E-02
Q9D8B7	Junctional adhesion molecule C	2.276	↑	1.18E-02
P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.238	↑	4.77E-02

P35846	Folate receptor alpha	2.217	↑	2.87E-02
Q9CQW3	Vitamin K-dependent protein Z	2.209	↑	1.82E-02
Q07113	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	2.142	↑	4.82E-02
P61110	Kidney androgen-regulated protein	2.141	↑	2.79E-02
Q05909	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	2.111	↑	4.16E-02
P13597	Intercellular adhesion molecule 1	2.082	↑	7.52E-03
P55104	Inhibin beta C chain	2.066	↑	1.25E-02
Q91WR8	Glutathione peroxidase 6	2.038	↑	1.64E-03
P20029	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	2.036	↑	2.49E-03
P51910	Apolipoprotein D	2.005	↑	2.82E-04
P31809	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	1.989	↑	2.69E-02
Q61826	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1	1.893	↑	4.18E-02
Q9ESD1	Prostasin	1.886	↑	7.35E-03
P28665	Murinoglobulin-1	1.886	↑	1.20E-02
P97300	Neuroplastin	1.817	↑	3.20E-02
Q03404	Trefoil factor 2	1.801	↑	1.36E-02
P14094	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	1.723	↑	3.97E-03
Q61147	Ceruloplasmin	1.720	↑	4.02E-03
Q9R1E6	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	1.671	↑	4.74E-03
P01898	H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	1.666	↑	1.39E-02
Q61398	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	1.606	↑	9.36E-04
P01027	Complement C3	1.603	↑	1.05E-03
Q91V08	C-type lectin domain family 2 member D	1.579	↑	1.43E-03
Q91X72	Hemopexin	1.572	↑	1.68E-02
Q61730	Interleukin-1 receptor accessory protein	1.549	↑	3.58E-02
Q9DC11	Plexin domain-containing protein 2	1.538	↑	3.68E-03
Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B	0.655	↓	8.02E-03
O35448	Lysosomal thioesterase PPT2	0.635	↓	1.37E-03
Q8BGB7	Enolase-phosphatase E1	0.635	↓	2.03E-02
P23780	Beta-galactosidase	0.634	↓	1.30E-03
Q923L3	CUB and sushi domain-containing protein 1	0.631	↓	3.90E-02
O35298	Acyloxyacyl hydrolase	0.597	↓	3.07E-02
P62737	Actin, aortic smooth muscle	0.590	↓	3.87E-02
Q9QWR8	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	0.579	↓	5.18E-03
P11152	Lipoprotein lipase	0.573	↓	1.51E-02
Q9CZT5	Vasorin	0.554	↓	1.22E-02
Q02819	Nucleobindin-1	0.547	↓	8.57E-03
Q09324	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	0.542	↓	4.52E-02
O89051	Integral membrane protein 2B	0.539	↓	9.07E-03
P70699	Lysosomal alpha-glucosidase	0.538	↓	1.83E-04
Q91ZI0	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	0.523	↓	1.01E-03
Q9JHY4	WAP four-disulfide core domain protein 15B	0.514	↓	4.51E-04

Q8VC60	Beta-galactosidase-1-like protein	0.498	↓	2.28E-03
Q9CQ60	6-phosphogluconolactonase	0.496	↓	1.91E-02
O08992	Syntenin-1	0.494	↓	1.59E-02
Q6RKD8	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1	0.446	↓	2.24E-02
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	0.429	↓	5.92E-03
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	0.393	↓	4.01E-03
Q64449	C-type mannose receptor 2	0.375	↓	1.81E-02
P08905	Lysozyme C-2	0.355	↓	1.37E-02
Q9ES90	G-protein coupled receptor 35	0.320	↓	3.48E-02
Q91XE4	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)	0.303	↓	1.30E-02
Q08761	Vitamin K-dependent protein S	0.300	↓	1.56E-02
P81117	Nucleobindin-2	0.259	↓	4.73E-02
Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	0.255	↓	1.68E-02
Q8K426	Resistin-like gamma	0.246	↓	9.67E-03
P12658	Calbindin	0.224	↓	2.72E-02
P26043	Radixin	0.193	↓	3.90E-02
Q9JLT2	Trehalase	0.153	↓	1.42E-02
P35505	Fumarylacetoacetase	0.123	↓	1.58E-02
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0.104	↓	2.37E-02
P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	0.086	↓	1.22E-03
O09051	Guanylate cyclase activator 2B	0.082	↓	3.43E-02
Q9DAS9	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	0.026	↓	8.22E-03
P61458	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	0.024	↓	3.14E-05
P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	0.011	↓	1.51E-02
P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	0.003	↓	4.58E-02
Q8VEM8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	0.000	↓	2.64E-02
P55849	Desmocollin-1	0.000	↓	2.50E-02
Q14BI7	ATP-dependent RNA helicase TDRD9	0.000	↓	2.31E-02
Q61247	Alpha-2-antiplasmin	0.000	↓	1.58E-02
O35215	D-dopachrome decarboxylase	0.000	↓	7.84E-04

将鉴定到的 96 个差异蛋白经过 DAVID 数据库进行生物学过程和分子功能分析，结果如图 7 所示。

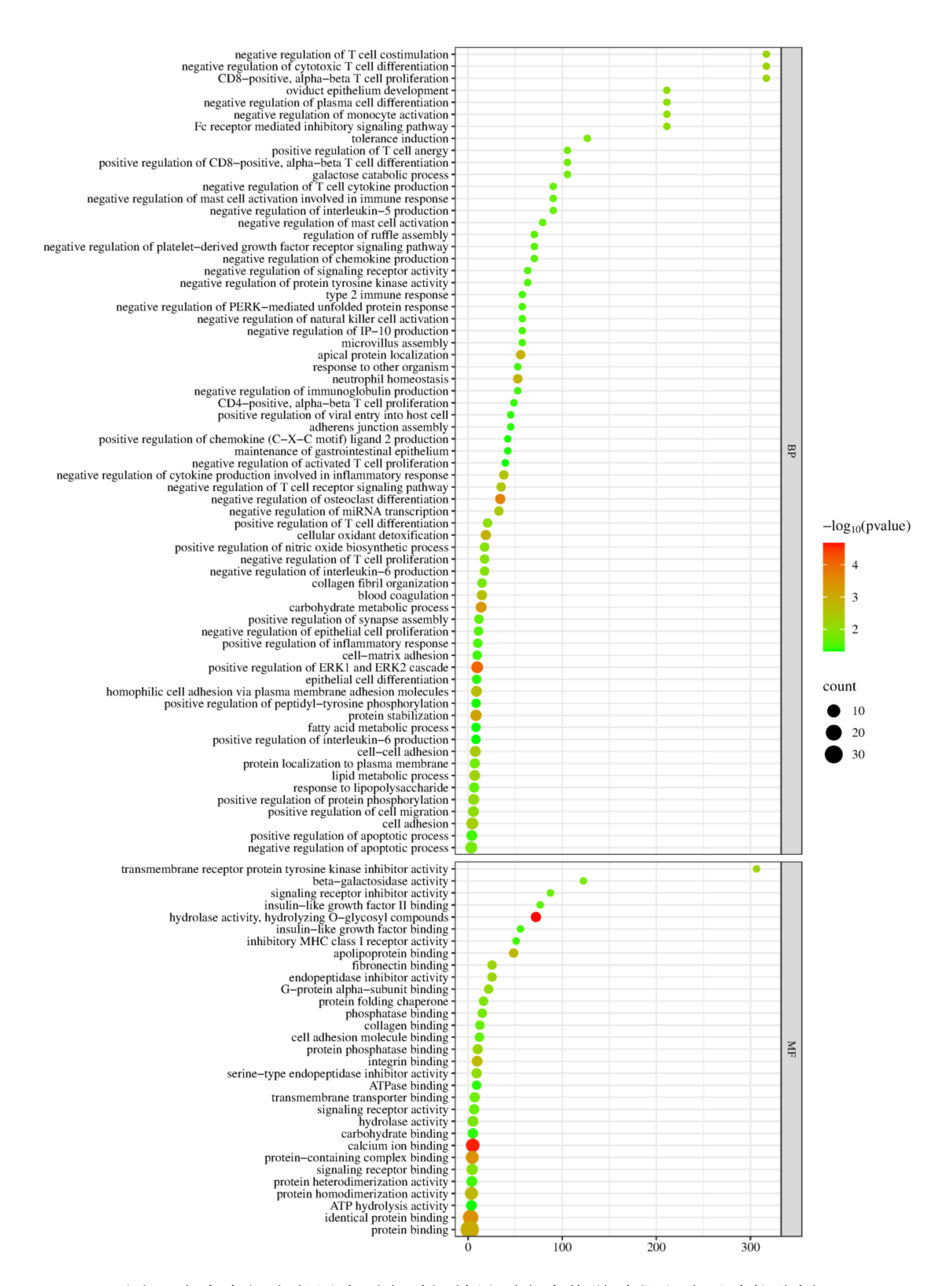


图 7 安赛蜜组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白生物学过程和分子功能分析

与蔗糖组和其它非营养性甜味剂组不同，安赛蜜组中出现了大量与免疫相关的生物学过程，如：Negative regulation of cytokine production involved in inflammatory response、Negative regulation of T cell receptor signaling pathway、Negative regulation of plasma cell differentiation 等；物质、能量代谢过程差异也较显著，如：Carbohydrate metabolic process、Fatty acid metabolic process、Galactose catabolic process 等，但所占比例远小于蔗糖组。分子功能中变化与信号转导、物质以及能量代谢相关，如：Hydrolase activity,

hydrolyzing O-glycosyl compounds、Calcium ion binding、Apolipoprotein binding、Beta-galactosidase activity、Insulin-like growth factor II binding 等，蔗糖组出现的与胰岛素相关分子功能在安赛蜜组也显示。

3.5.2 差异蛋白与脑奖励回路

通过 Uniprot 检索安赛蜜组差异蛋白的功能和涉及的生物学过程，寻找是否与已报道的脑奖励回路中的关键蛋白相关，结果如

表 8 所示，小鼠自主食用安赛蜜前后尿液蛋白质组差异蛋白中能够检索到和脑奖励回路相关的蛋白。

表 8 甜菊糖苷组个体食用甜菊糖苷后前尿液蛋白质组差异蛋白与脑奖励回路相关的蛋白

The Brain's Reward Circuitry	
Glutamate	√
Dopamine	√
Gamma-aminobutyric acid / GABA	√
Substance P	
Enkephalin	

Neuronal membrane glycoprotein M6-a 在神经元可塑性中起作用，参与神经分化，包括神经干细胞的分化和迁移，参与神经突和丝状足的生长，丝状足的运动，可能还参与突触的形成。在轴突生长锥、树突棘、谷氨酸能突触、神经元胞体、平行纤维与浦肯野细胞突触、突触前活性区膜等区域表达，参与到神经元迁移、神经元投射发育、神经元投射形态发生、突触组织的调控、突触组装等生物学过程中。

Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 具有多巴胺受体结合、γ-氨基丁酸跨膜转运等功能，参与到腺苷酸环化酶激活多巴胺受体信号通路、磷脂酶 c 激活多巴胺受体信号通路等生物学过程中。

Calbindin 在轴突、树突、树突棘、gamma-aminobutyric acid 能突触、谷氨酸能突触、神经元胞体等区域中表达，参与到突触可塑性调控、通过钙离子结合调节突触前后胞质钙离子浓度、突触前胞质钙离子浓度的调节、长期记忆、短期记忆等生物学过程中。

Glutathione hydrolase 1 proenzyme 具有谷胱甘肽水解酶活性，参与谷胱甘肽的分解代谢、谷氨酸的跨膜转运、谷氨酸的代谢过程和对酒精的反应。

Syntenin-1 参与到嗜离子性谷氨酸受体结合和突触前组装等生物学过程中。

Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 是神经系统形成过程中，在细胞间信号传导中起重要作用的受体；参与到轴突束颤、多巴胺能神经元轴突引导、运动神经元迁移、平面细胞极性通路参与轴突引导、5-羟色胺能神经元轴突引导等生物学过程中。

Ephrin type-B receptor 2 在轴突、树突、树突棘、谷氨酸能突触、神经元胞体、突触后膜、突触前膜、突触等区域表达，具有调节树突棘发育成熟，刺激兴奋性突触形成的功能。参与到轴突发生、中枢神经系统投射神经元轴突发生、联合神经元轴突引导、树突棘形态发生、学习和记忆、神经元投射收缩、树突棘形态发生的正调控、长期神经元突触可塑性的正调节、长期突触增强的正调节、突触组装的正调控、突触可塑性的正向调节、突触后膜组装、轴突发生调控、神经突触可塑性调控、突触组装的调控、跨突触复合体对突触传递的调节作用等生物学过程中。

Interleukin-1 receptor accessory protein 位于谷氨酸能突触中，可通过跨突触与蛋白酪氨酸磷酸酶受体 D 结合，双向诱导神经元的突触前和突触后分化。

3.6 安赛蜜组个体尿液蛋白质组前后分析

分别将单个小鼠食用安赛蜜后的尿液蛋白质组与食用安赛蜜前的尿液蛋白质组进行比

较，筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或 ≤0.67，双尾 t 检验 P<0.05，统计共有的差异蛋白，结果如图 8 所示。

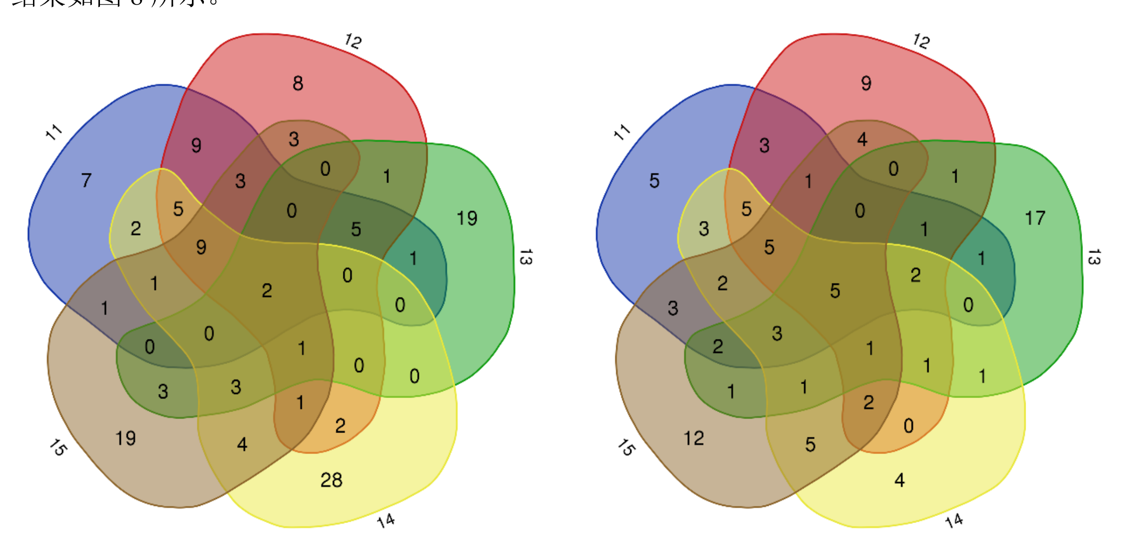


图 8 安赛蜜组个体食用安赛蜜后前共有上调差异蛋白（左）下调差异蛋白（右）

7 个共有差异蛋白，如表 9 所示。通过 Uniprot 检索蛋白的功能和涉及的生物学过程，Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 具有多巴胺受体结合、γ-氨基丁酸跨膜转运等功能，参与到腺苷酸环化酶激活多巴胺受体信号通路、磷脂酶 c 激活多巴胺受体信号通路等生物学过程中； Glutathione hydrolase 1 proenzyme 能够裂解细胞外谷胱甘肽及其偶联物和其他 γ -谷氨酰化合物的 γ -谷氨酰键，参与谷胱甘肽代谢、谷氨酸的代谢、对脂多糖和酒精的反应等生物学过程中；2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase 具有催化正常代谢过程中形成的烯胺/亚胺中间体的水解脱胺、促进核糖核酸酶 P/MRP 复合体的募集来促进核糖核酸内裂解的功能，参与到脂质代谢、mRNA 分解、翻译负调控等生物学过程中；Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 具有电压门控单原子离子通道活性，能够结合 ATP、神经酰胺、磷脂酰胆碱和胆固醇等，参与到化学性突触传递、学习、神经元间突触传递等过程中；Peroxiredoxin-5, mitochondrial 可通过解毒过氧化物在细胞抵御氧化应激中发挥作用，并作为过氧化氢介导的信号事件的传感器；Protein S100-A9 是一种可结合钙和锌的蛋白质，在调节炎症过程和免疫反应中发挥着重要作用。

表 9 安赛蜜组个体食用安赛蜜后前共有差异蛋白

Uniprot ID	Protein name	Trend
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	↓
Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	↓
P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	↓
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	↓
P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	↓
Q9JI02	Secretoglobin family 2B member 20	↑
P31725	Protein S100-A9	↑

通过 Uniprot 检索单个小鼠自主食用安赛蜜前后尿液蛋白质组的差异蛋白功能和参与的生物学过程，查找是否与脑奖励回路蛋白相关，如表 10 所示。单只小鼠自主食用安赛蜜前后尿液蛋白质组的差异蛋白中均出现与脑奖励回路相关的蛋白，但种类和数量具有差异。

表 10 安赛蜜组个体食用安赛蜜后前尿液蛋白质组差异蛋白中与脑奖励回路相关的蛋白

	Glutamate	Dopamine	Gamma-aminobutyric acid GABA	Substance P	Enkephalin
11	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Calbindin	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Calbindin		
12	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Calbindin Frizzled-4	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Calbindin		
13	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Interleukin-1 receptor accessory protein	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Stromal cell-derived factor 1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1		
14	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Calbindin Profilin-1 Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Sepiapterin reductase Stromal cell-derived factor 1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Calbindin		
15	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Frizzled-4 Amino acid transporter heavy chain SLC3A1 (D2) Syntenin-1 Neuronal membrane glycoprotein M6-a	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Sepiapterin reductase	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Ephrin-A5 (AL-1) Carbonic anhydrase 2		

3.7 三氯蔗糖组尿液蛋白质组的成组分析

3.7.1 差异蛋白功能分析

将三氯蔗糖实验组与三氯蔗糖对照组尿液蛋白质组进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67，双尾 t 检验 $P < 0.05$。结果表明，三氯蔗糖实验组与三氯蔗糖对照组相比，可以鉴定到 71 个差异蛋白，将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，结果如表 11 所示。

表 11 三氯蔗糖实验组与三氯蔗糖对照组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein names	Fold change	Trend	P value
P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A	∞	↑	2.36E-02
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	∞	↑	2.75E-05
P62962	Profilin-1	2930.285	↑	2.66E-02
P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18	48.213	↑	9.03E-04
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	45.174	↑	3.87E-02
P50543	Protein S100-A11	41.961	↑	2.65E-02
O70250	Phosphoglycerate mutase 2	30.187	↑	4.65E-02
P52480	Pyruvate kinase PKM	29.633	↑	1.14E-02
P30275	Creatine kinase U-type, mitochondrial	23.354	↑	3.73E-02
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	23.226	↑	3.00E-02
Q9DCG2	CD302 antigen	21.131	↑	2.39E-02
P45376	Aldo-keto reductase family 1 member B1	20.342	↑	3.87E-02
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	16.303	↑	1.79E-02
P17182	Alpha-enolase	13.961	↑	3.87E-02
P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	12.205	↑	1.72E-02
Q80X90	Filamin-B	9.021	↑	4.94E-02

Q00724	Retinol-binding protein 4	8.998	↑	3.03E-02
P28665	Murinoglobulin-1	7.723	↑	3.00E-02
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	5.825	↑	3.17E-02
P12658	Calbindin	5.638	↑	3.25E-02
P00688	Pancreatic alpha-amylase	4.783	↑	4.41E-02
Q61147	Ceruloplasmin	3.949	↑	7.54E-03
Q64726	Zinc-alpha-2-glycoprotein	3.920	↑	1.26E-02
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	3.674	↑	2.43E-02
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	3.670	↑	3.16E-02
P35700	Peroxiredoxin-1	3.312	↑	3.99E-02
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	2.129	↑	2.23E-02
Q921I1	Serotransferrin	1.855	↑	3.47E-02
Q06890	Clusterin	0.653	↓	1.58E-02
Q9D8B7	Junctional adhesion molecule C	0.629	↓	2.68E-02
P04939	Major urinary protein 3	0.597	↓	1.52E-04
P97808	FXYD domain-containing ion transport regulator 5	0.588	↓	1.20E-02
Q61090	Frizzled-7	0.575	↓	4.21E-02
P10493	Nidogen-1	0.567	↓	1.61E-02
P97426	Eosinophil cationic protein 1	0.555	↓	4.98E-02
P55288	Cadherin-11	0.538	↓	2.49E-02
Q9Z319	Atrial natriuretic peptide-converting enzyme	0.536	↓	6.48E-03
Q9R1P3	Proteasome subunit beta type-2	0.527	↓	2.92E-03
O89017	Legumain	0.517	↓	3.84E-02
Q9DBH5	Vesicular integral-membrane protein VIP36	0.509	↓	1.92E-02
Q60823	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	0.502	↓	3.90E-02
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	0.491	↓	4.54E-02
P03953	Complement factor D	0.486	↓	2.69E-02
P11588	Major urinary protein 1	0.481	↓	3.19E-02
B5X0G2	Major urinary protein 17	0.477	↓	1.36E-03
Q91XE4	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)	0.462	↓	3.28E-02
Q6PDN3	Myosin light chain kinase, smooth muscle	0.457	↓	1.76E-02
Q6ZWQ0	Nesprin-2	0.441	↓	3.43E-04
P12023	Amyloid-beta A4 protein	0.434	↓	8.42E-03
Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase	0.430	↓	2.70E-02
P25119	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	0.426	↓	3.54E-02
P61110	Kidney androgen-regulated protein	0.387	↓	4.64E-02
O88307	Sortilin-related receptor	0.387	↓	4.03E-02
Q91WV7	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	0.377	↓	1.76E-02
P04186	Complement factor B	0.368	↓	2.66E-02
Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	0.358	↓	9.75E-03
P04441	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain	0.346	↓	3.49E-02
Q61592	Growth arrest-specific protein 6	0.331	↓	5.20E-03
O08810	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	0.300	↓	3.72E-02
O35188	Fractalkine	0.282	↓	5.28E-03
Q9JHY3	WAP four-disulfide core domain protein 12	0.273	↓	2.58E-02
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	0.270	↓	7.10E-03
P10923	Osteopontin	0.255	↓	2.19E-02
P47878	Insulin-like growth factor-binding protein 3	0.252	↓	4.14E-02
Q91WZ8	Dysbindin	0.244	↓	9.70E-03

Q02596	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	0.226	↓	1.90E-02
P70663	SPARC-like protein 1	0.181	↓	3.55E-02
P41272	CD27 antigen	0.181	↓	2.44E-03
P51655	Glypican-4	0.155	↓	3.53E-02
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0.136	↓	1.04E-02
Q8R1U2	Cell growth regulator with EF hand domain protein 1	0.099	↓	4.39E-02

将鉴定到的 71 个差异蛋白经过 DAVID 数据库进行生物学过程和分子功能分析，结果如图 9 所示。

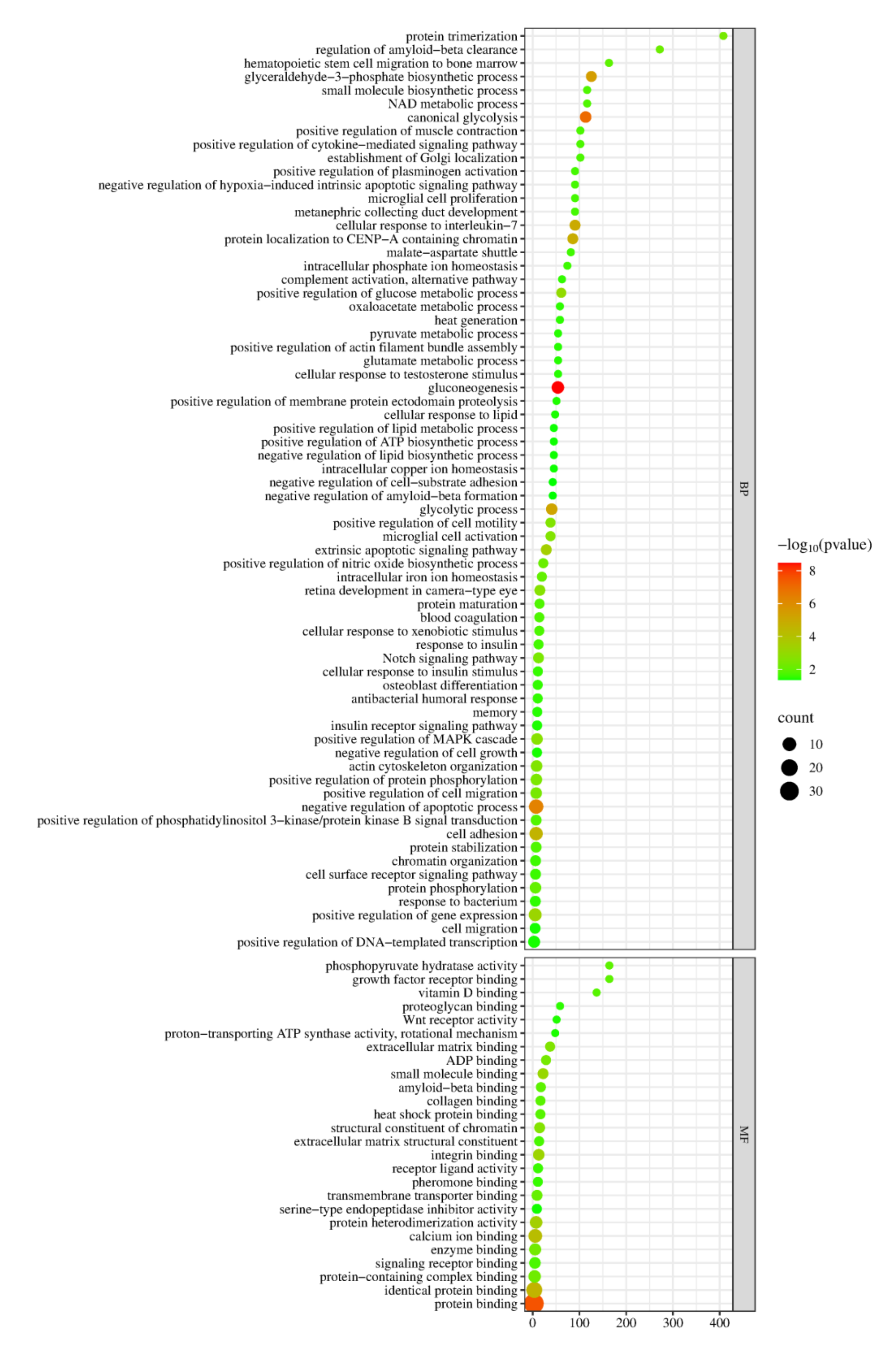


图 9 三氯蔗糖组小鼠差异蛋白分子功能和生物学过程分析

与蔗糖组相似，三氯蔗糖组其中变化最显著、占比大的生物学过程与糖代谢、热的产生相关，如：gluconeogenesis、canonical glycolysis、glycolytic process、glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process、positive regulation of glucose metabolic process。三氯蔗糖组虽然出现细胞分裂、免疫相关的生物学过程，但不如甜菊糖苷、安赛蜜的变化明显。分子

功能中变化与分子结合相关，如：Protein binding、Identical protein binding、Calcium ion binding 等。

3.7.2 差异蛋白与脑奖励回路

通过 Uniprot 检索三氯蔗糖组差异蛋白的功能和涉及的生物学过程，寻找是否与已报道的脑奖励回路中的关键蛋白相关，结果如表 12 所示，小鼠自主食用三氯蔗糖前后尿液蛋白质组差异蛋白中能够检索到和脑奖励回路相关的蛋白。

表 12 三氯蔗糖组小鼠尿液蛋白质组差异蛋白与脑奖励回路

The Brain's Reward Circuitry	
Glutamate	√
Dopamine	√
Gamma-aminobutyric acid / GABA	√
Substance P	
Enkephalin	

Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 具有多巴胺受体结合、γ-氨基丁酸跨膜转运等功能，参与到腺苷酸环化酶激活多巴胺受体信号通路、磷脂酶 c 激活多巴胺受体信号通路等生物学过程中。

Glypican-4 位于谷氨酸能突触、突触及前膜等区域表达，能参与中枢神经系统的发育，参与到神经递质受体定位对突触后特化膜的调控、突触前组装的调控、突触膜粘附等生物学过程中。

SPARC-like protein 1 位于谷氨酸能突触，参与到信号转导和突触膜黏附过程。

Glutathione hydrolase 1 proenzyme 具有谷胱甘肽水解酶活性，参与谷胱甘肽的分解代谢、谷氨酸的代谢过程和对酒精的反应。Amyloid-beta precursor protein 作为细胞表面受体，在神经元表面执行与神经突生长、神经元粘附和轴突发生有关的生理功能；参与学习和记忆、谷氨酸受体信号通路、联想学习、神经元分化等生物学过程中。

Amino acid transporter heavy chain SLC3A1 参与到谷氨酸的跨膜转运。

Amyloid-beta precursor protein 作为细胞表面受体，在神经元表面执行与神经突生长、神经元粘附和轴突发生有关的生理功能；参与学习和记忆、谷氨酸受体信号通路、联想学习、神经元分化等生物学过程中。

Cadherin-11 在谷氨酸能突触等区域中表达，参与到皮质脊髓束形态发生、化学突触传递的调节等生物学过程中。

14-3-3 protein zeta/delta 在谷氨酸能突触等区域表达，参与到突触成熟的调控、突触目标的识别等生物学过程中。

Calbindin 在轴突、树突、树突棘、gamma-aminobutyric acid 能突触、谷氨酸能突触、神经元胞体等区域中表达，参与到突触可塑性调控、通过钙离子结合调节突触前后胞质钙离子浓度、突触前胞质钙离子浓度的调节、长期记忆、短期记忆等生物学过程中。

Aspartate aminotransferase, cytoplasmic 能催化合成谷氨酸：脊椎动物中枢神经系统的主要兴奋性神经递质，是谷氨酸水平的重要调节剂。在脑神经保护中起谷氨酸清除剂的作用。参与到谷氨酸合成和分解代谢等生物学过程中。

Profilin-1 在谷氨酸能突触、突触前后细胞等区域表达，参与到化学突触传递的调节、突触成熟等生物学过程中。

3.8 三氯蔗糖组个体尿液蛋白质组的前后分析

分别将单个小鼠食用三氯蔗糖后的尿液蛋白质组与食用三氯蔗糖前的尿液蛋白质组进行比较，筛选差异蛋白条件为：$FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67，双尾 t 检验 $P < 0.05$，统计共有的差异

蛋白，结果如图 10 所示。

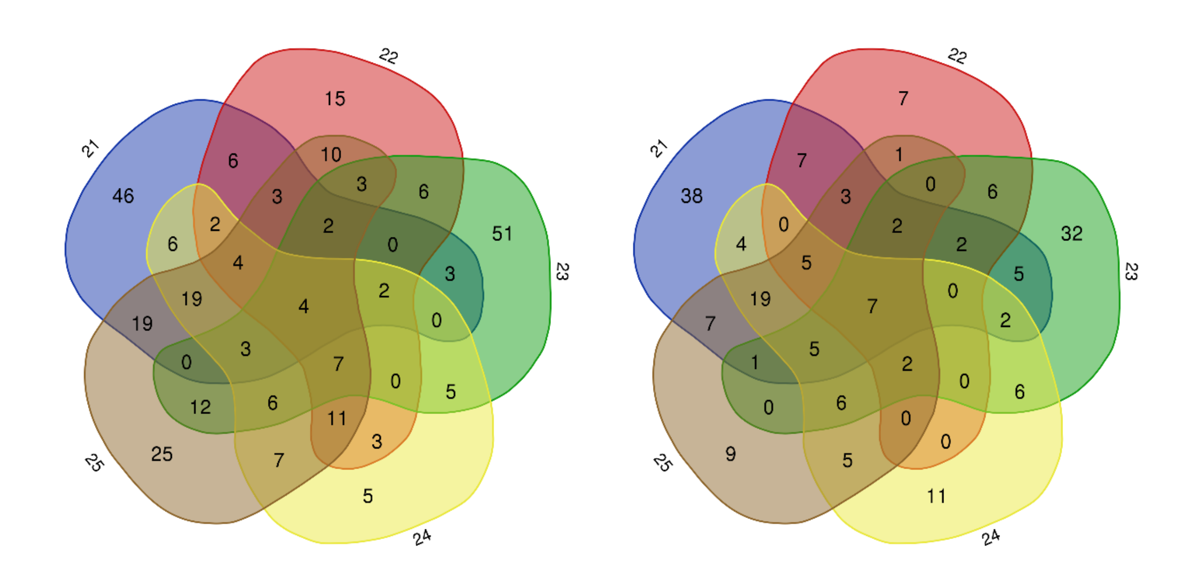


图 10 三氯蔗糖组个体食用三氯蔗糖后前共有上调差异蛋白（左）下调差异蛋白（右）

11 个共有差异蛋白，如表 13 所示。其中 Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 具有多巴胺受体结合、γ-氨基丁酸跨膜转运等功能，参与到腺苷酸环化酶激活多巴胺受体信号通路、磷脂酶 c 激活多巴胺受体信号通路等生物学过程中；Glutathione hydrolase 1 proenzyme 能够裂解细胞外谷胱甘肽及其偶联物和其他 γ -谷氨酰化合物的 γ -谷氨酰键，参与谷胱甘肽代谢、谷氨酸的代谢、对脂多糖和酒精的反应等生物学过程中；Collagen alpha-1(I) chain 参与到细胞对葡萄糖刺激的翻译、对胰岛素的反应等过程中；Major urinary protein 3 具有胰岛素受体活性，参与到有氧呼吸、细胞对脂质的反应、能量储备代谢、葡萄糖稳态产热等过程中；Phosphoglycerate kinase 1 催化糖酵解途径中一种 ATP 生成反应，参与到经典糖酵解、葡萄糖异生等过程中。结果表明，小鼠在自主食用三氯蔗糖前后，其尿液蛋白质组中所出现的差异蛋白在不同个体之间存在一定程度的差异。

表 13 三氯蔗糖组个体食用三氯蔗糖后前共有差异蛋白

Uniprot ID	Protein name	Trend
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	↓
Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzym	↓
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	↓
P10923	Osteopontin (2AR)	↓
P41272	CD27 antigen	↓
P04939	Major urinary protein 3	↓
Q02596	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	↓
P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18	↑
P15626	Glutathione S-transferase Mu 2	↑
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	↑
Q61147	Ceruloplasmin	↑

通过 Uniprot 检索单个小鼠自主食用三氯蔗糖前后尿液蛋白质组的差异蛋白功能和参与的生物学过程，查找是否与脑奖励回路蛋白相关，如表 14 所示。单只小鼠自主食用三氯蔗糖前后尿液蛋白质组的差异蛋白中均出现与脑奖励回路相关的蛋白，但种类和数量具有差异。

表 14 三氯蔗糖组个体食用三氯蔗糖后前尿液蛋白质组差异蛋白中与脑奖励回路相关的蛋白

	Glutamate	Dopamine	Gamma-aminobutyric acid GABA	Substance P	Enkephalin
21	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin-11 Aspartate aminotransferase, cytoplasmic 14-3-3 protein zeta/delta Amino acid transporter heavy chain SLC3A1 (D2) Myc box-dependent-interacting protein 1 Amyloid-beta precursor protein Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Palmitoyltransferase ZDHHC8 Glypican-4 Epidermal growth factor receptor	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Palmitoyltransferase ZDHHC8	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Carbonic anhydrase 2 Calbindin Cadherin-13	Angiotensin-converting enzyme	Angiotensin-converting enzyme
22	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin-11 Actin, cytoplasmic 1 Amino acid transporter heavy chain SLC3A1 (D2) Transitional endoplasmic reticulum ATPase Cofilin-1 Profilin-1 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Parkinson disease protein 7 homolog	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Carbonic anhydrase 2 Calbindin	Angiotensin-converting enzyme	Angiotensin-converting enzyme
23	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Aspartate aminotransferase, cytoplasmic 14-3-3 protein zeta/delta Actin, cytoplasmic 1 Amino acid transporter heavy chain SLC3A1 (D2) Myc box-dependent-interacting protein 1 Transitional endoplasmic reticulum ATPase Podocalyxin Dystroglycan 1 Amino acid transporter heavy chain SLC3A2 Ornithine aminotransferase, mitochondrial SPARC-like protein 1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Sepiapterin reductase Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Dystroglycan 1	Angiotensin-converting enzyme	Angiotensin-converting enzyme
24	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin-11 Aspartate aminotransferase, cytoplasmic 14-3-3 protein zeta/delta Actin, cytoplasmic 1 Myc box-dependent-interacting protein 1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF Parkinson disease protein 7 homolog	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Carbonic anhydrase 2 Calbindin Cadherin-13		
25	Glutathione hydrolase 1 proenzyme Cadherin-11 Aspartate aminotransferase, cytoplasmic 14-3-3 protein zeta/delta Actin, cytoplasmic 1 Amyloid-beta precursor protein Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Cofilin-1 Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta Heat shock cognate 71 kDa protein Fibroblast growth factor receptor 1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Parkinson disease protein 7 homolog Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Carbonic anhydrase 2 Calbindin Cadherin-13		

3.9 4 种甜味物质的横向比较

3.9.1 4 种甜味物质的成组分析

成组分析中，蔗糖组、甜菊糖苷组、安赛蜜组、三氯蔗糖组，自主食用甜味物质前后尿液蛋白质组分别有 43、60、96、71 个差异蛋白，统计 4 种甜味物质的共有差异蛋白，如图 11 所示。

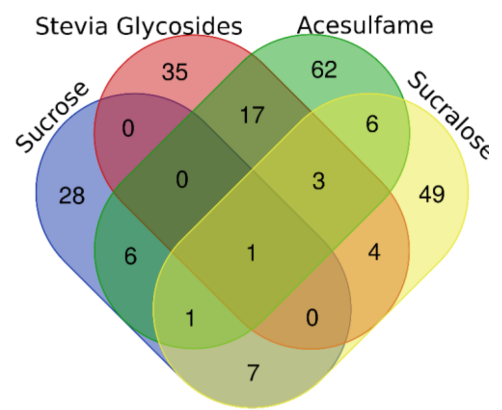


图 11 4 种甜味物质成组分析的共有差异蛋白

4 种甜味物质仅有 1 个共同差异蛋白，甜菊糖苷组和安赛蜜组共有差异蛋白最多共 21 个，蔗糖组和三氯蔗糖组共有差异蛋白其次共 11 个，蔗糖组和甜菊糖苷组共有差异蛋白最少只有 1 个，具体共有差异蛋白见附录 1。

成组分析中，自主食用甜味物质前后尿液蛋白质组差异蛋白主要参与的生物学过程也并不相同，蔗糖组主要是物质代谢、产热过程；甜菊糖苷组则是细胞分裂、染色质组成；安赛蜜组出现了大量的细胞、体液免疫过程；三氯蔗糖组也主要与产热糖代谢相关，但比例略低于蔗糖组。这些结果说明自主食用不同甜味物质前后尿液蛋白质组的差异也不同。

成组分析中，自主食用甜味物质前后尿液蛋白质组差异蛋白中均包含与脑奖励回路相关的蛋白，但种类和数量有所差别，如表 15 所示。

表 15 4 种甜味物质成组分析中与脑奖励回路的差异蛋白

	Glutamate	Dopamine	Gamma-aminobutyric acid GABA	Substance P	Enkephalin
Sucrose	Podocalyxin Tenascin 14-3-3 protein zeta/delta Neogenin		Acyl-CoA-binding protein Carbonic anhydrase 2	Enkephalinase	Procathepsin L
Stevia Glycosides	Frizzled-4 Glypican-4 Glutathione hydrolase 1 proenzyme	Sepiapterin reductase Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	Angiotensin-converting enzyme	
Acesulfame	Neuronal membrane glycoprotein M6-a Calbindin Glutathione hydrolase 1 Syntenin-1 proenzyme Ephrin type-B receptor 2 Interleukin-1 receptor accessory protein	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 Calbindin		
Sucralose	Glypican-4 SPARC-like protein 1 Glutathione hydrolase 1 proenzyme Amino acid transporter heavy chain SLC3A1 Amyloid-beta precursor protein Cadherin-11 14-3-3 protein zeta/delta Aspartate aminotransferase, cytoplasmic Profilin-1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	Calbindin		

3.9.2 4 种甜味物质的前后分析

前后分析中，蔗糖组、甜菊糖苷组、安赛蜜组、三氯蔗糖组，分别有 0、3、7、11 个共有差异蛋白;对单个个体食用甜味物质前后尿液蛋白质组差异蛋白中与脑奖励回路相关蛋白的检索也发现,所有小鼠自主食用甜味物质前后尿液蛋白质组的差异蛋白中均出现与脑奖励回路相关的蛋白，但种类和数量具有差异。这提示我们小鼠在自主食用不同甜味物质前后，其尿液蛋白质组中所出现的差异蛋白在不同个体之间存在一定程度的差异,这种个体差异有可能是因为小鼠自主食用甜味物质时的时间、用量差异导致的。

4 结论

本研究表明，自主食用甜味物质前后小鼠的尿液蛋白质组中出现差异，且自主食用不同甜味物质所出现的差异也不相同。这进一步拓宽了尿液蛋白质组的敏感性的边界，同时也为研究包括甜味物质在内的各类食品添加剂对机体可能产生的潜在影响，提供了一个新的研究策略。

参考文献

[1] Walton J, Bell H, Re R, et al. Current perspectives on global sugar consumption: definitions, recommendations, population intakes, challenges and future direction[J]. Nutrition Research Reviews, 2023, 36(1): 1-22.

[2] Freeman C R, Zehra A, Ramirez V, et al. Impact of sugar on the body, brain, and behavior[J]. Frontiers in Bioscience (Landmark Edition), 2018, 23(12): 2255-2266.

[3] Lenoir M, Serre F, Cantin L, et al. Intense sweetness surpasses cocaine reward[J]. PloS One, 2007, 2(8): e698.

[4] Qin P, Li Q, Zhao Y, et al. Sugar and artificially sweetened beverages and risk of obesity, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and all-cause mortality: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies[J]. European Journal of Epidemiology, 2020, 35(7): 655-671.

[5] Imamura F, O'Connor L, Ye Z, et al. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction[J]. BMJ (Clinical research ed.), 2015, 351: h3576.

[6] Xi B, Huang Y, Reilly K H, et al. Sugar-sweetened beverages and risk of hypertension and CVD: a dose-response meta-analysis[J]. The British Journal of Nutrition, 2015, 113(5): 709-717.

[7] Asgari-Taee F, Zerafati-Shoae N, Dehghani M, et al. Association of sugar sweetened beverages consumption with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis[J]. European Journal of Nutrition, 2019, 58(5): 1759-1769.

[8] Valenzuela M J, Waterhouse B, Aggarwal V R, et al. Effect of sugar-sweetened beverages on oral health: a systematic review and meta-analysis[J]. European Journal of Public Health, 2021, 31(1): 122-129.

[9] Llaha F, Gil-Lespinard M, Unal P, et al. Consumption of Sweet Beverages and Cancer Risk. A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies[J]. Nutrients, 2021, 13(2): 516.

[10] Lange F T, Scheurer M, Brauch H J. Artificial sweeteners--a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 403(9): 2503-2518.

[11] Wilk K, Korytek W, Pelczyńska M, et al. The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review[J]. Nutrients, 2022, 14(6): 1261.

[12] Praveena S M, Cheema M S, Guo H R. Non-nutritive artificial sweeteners as an emerging contaminant in environment: A global review and risks perspectives[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 170: 699-707.

[13] Lin J, Curhan G C. Associations of sugar and artificially sweetened soda with albuminuria and kidney function decline in women[J]. Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN, 2011, 6(1): 160-166.

[14] Yin T, Li J, Wang Y, et al. Artificially Sweetened Beverage Consumption and Cancer Risk: A Comprehensive Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies[J]. Nutrients,

2022, 14(21): 4445.
[15] Pepino M Y, Tiemann C D, Patterson B W, et al. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load[J]. Diabetes Care, 2013, 36(9): 2530-2535.
[16] Gao Y. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?[J]. Science China. Life Sciences, 2013, 56(12): 1145-1146.
[17] Logue C, Dowey L C, Strain J J, et al. The potential application of a biomarker approach for the investigation of low-calorie sweetener exposure[J]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2016, 75(2): 216-225.
[18] Sclafani A, Bahrani M, Zukerman S, et al. Stevia and saccharin preferences in rats and mice[J]. Chemical Senses, 2010, 35(5): 433-443.
[19] Yin K J, Xie D Y, Zhao L, et al. Effects of different sweeteners on behavior and neurotransmitters release in mice[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(1): 113-121.
[20] Gardner E L. Addiction and brain reward and antireward pathways[J]. Advances in Psychosomatic Medicine, 2011, 30: 22-60.
[21] Renaud-Pageot C, Quivy J P, Lochhead M, et al. CENP-A Regulation and Cancer[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 907120.

附　录

附录 1 4 种甜味物质的成组分析的差异蛋白

Samples	Total	Uniprot ID	Protein names
Acesulfame Stevia Glycosides Sucralose Sucrose	1	Q61147	Ceruloplasmin
Acesulfame Sucralose Sucrose	1	P28665	Murinoglobulin-1
Acesulfame Stevia Glycosides Sucralose	3	P70441	Na
		Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzyme
		Q60823	RAC-beta serine/threonine-protein kinase
Acesulfame Sucrose	6	P57096	Prostate stem cell antigen
		Q91V08	C-type lectin domain family 2 member D
		A1L317	Keratin, type I cytoskeletal 24
		Q6RKD8	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1
		Q9QWR8	Alpha-N-acetylgalactosaminidase
		P11152	Lipoprotein lipase
Sucralose Sucrose	7	P11087	Collagen alpha-1
		Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein
		P97426	Eosinophil cationic protein 1
		P63101	14-3-3 protein zeta/delta
		P41272	CD27 antigen
		Q921I1	Serotransferrin
		P04939	Major urinary protein 3
Acesulfame Stevia Glycosides	17	P08905	Lysozyme C-2
		P62737	Actin, aortic smooth muscle
		O35215	D-dopachrome decarboxylase
		P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase
		P13597	Intercellular adhesion molecule 1
		P51910	Apolipoprotein D
		Q9DAS9	Guanine nucleotide-binding protein G
		Q61398	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1
		O54965	E3 ubiquitin-protein ligase RNF13
		Q9R1E6	Autotaxin
		P35505	Fumarylacetoacetase
		P61458	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase
		P10649	Glutathione S-transferase Mu 1
		Q08761	Vitamin K-dependent protein S

		Q9ES90	G-protein coupled receptor 35
		Q9DAU7	WAP four-disulfide core domain protein 2
		Q03404	Trefoil factor 2
Stevia Glycosides Sucralose	4	P51655	Glypican-4
		P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
		Q64726	Zinc-alpha-2-glycoprotein
		P03953	Complement factor D
Acesulfame Sucralose	6	P04441	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain
		P12658	Calbindin
		P61110	Kidney androgen-regulated protein
		Q91XE4	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase
		P47878	Insulin-like growth factor-binding protein 3
		Q9D8B7	Junctional adhesion molecule C
Sucrose	28	Q9R0M4	Podocalyxin
		P11591	Major urinary protein 5
		P21614	Vitamin D-binding protein
		P97798	Neogenin
		P45700	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA
		Q06770	Corticosteroid-binding globulin
		P06797	Procathepsin L
		P13634	Carbonic anhydrase 1
		P31786	Acyl-CoA-binding protein
		Q920A5	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase
		Q80X71	Transmembrane protein 106B
		O09131	Glutathione S-transferase omega-1
		Q61391	Neprilysin
		P05533	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1
		Q8QZR4	Out at first protein homolog
		P06869	Urokinase-type plasminogen activator
		P26262	Plasma kallikrein
		P46412	Glutathione peroxidase 3
		E9PV24	Fibrinogen alpha chain [Cleaved into: Fibrinopeptide A; Fibrinogen alpha chain]
		P49183	Deoxyribonuclease-1
		O88322	Nidogen-2
		P11352	Glutathione peroxidase 1
		P00920	Carbonic anhydrase 2
		Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5
		Q80YX1	Tenascin
		P04940	Ig kappa chain V-VI region NQ2-17.4.1
		A2BIM8	Major urinary protein 18

		Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1
Stevia Glycosides	35	P62806	Histone H4
		P07141	Macrophage colony-stimulating factor 1
		Q01721	Growth arrest-specific protein 1
		P15501	Prostatic spermine-binding protein
		Q921W8	Secreted and transmembrane protein 1A
		Q8K1H9	Odorant-binding protein 2a
		P48441	Alpha-L-iduronidase
		Q8C110	SLIT and NTRK-like protein 6
		P62715	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform
		P00687	Alpha-amylase 1
		Q8CIF4	Biotinidase
		Q8BX35	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 27
		Q5FW60	Major urinary protein 20
		Q6UGQ3	Secretoglobin family 2B member 2
		Q9Z0M9	Interleukin-18-binding protein
		Q9D7R7	Gastricsin
		P18572	Basigin
		Q8R0W0	Epiplakin
		Q8BWP8	Beta-1,4-glucuronyltransferase 1
		P19221	Prothrombin
		P07361	Alpha-1-acid glycoprotein 2
		P02816	Prolactin-inducible protein homolog
		O08709	Peroxiredoxin-6
		Q64105	Sepiapterin reductase
		P15949	Kallikrein 1-related peptidase b9
		Q7TSK7	ADAMTS-like protein 2
		P11590	Major urinary protein 4
		Q3UMW8	Bis
		P18181	CD48 antigen
		Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1
		Q61088	Frizzled-4
		Q6PGG6	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein
		P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
		Q8BZT5	Leucine-rich repeat-containing protein 19
		P70210	Transcriptional enhancer factor TEF-5
Acesulfame	62	P01027	Complement C3
		Q9ESD1	Prostasin
		Q91X72	Hemopexin
		Q8VEM8	Solute carrier family 25 member 3

	P55104	Inhibin beta C chain
	Q91ZI0	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
	Q9CRD2	ER membrane protein complex subunit 2
	Q60932	Non-selective voltage-gated ion channel VDAC1
	P51885	Lumican
	Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B
	Q61247	Alpha-2-antiplasmin
	Q64729	TGF-beta receptor type-1
	Q61495	Desmoglein-1-alpha
	Q64449	C-type mannose receptor 2
	Q02819	Nucleobindin-1
	P35461	Lymphocyte antigen 6G
	Q9R007	C-type lectin domain family 5 member A
	Q91WR8	Glutathione peroxidase 6
	P55849	Desmocollin-1
	P26043	Radixin
	Q9CQW3	Vitamin K-dependent protein Z
	O09051	Guanylate cyclase activator 2B [Cleaved into: Uroguanylin
	Q8BGB7	Enolase-phosphatase E1
	P97300	Neuroplastin
	Q811B3	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12
	O89051	Integral membrane protein 2B
	P31725	Protein S100-A9
	Q14BI7	ATP-dependent RNA helicase TDRD9
	Q9JM99	Proteoglycan 4
	P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha
	Q07113	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
	P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial
	Q9CZT5	Vasorin
	P35846	Folate receptor alpha
	Q64281	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4A
	P70699	Lysosomal alpha-glucosidase
	P01898	H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain
	Q923L3	CUB and sushi domain-containing protein 1
	P09103	Protein disulfide-isomerase
	Q61730	Interleukin-1 receptor accessory protein
	P31809	Cell adhesion molecule CEACAM1

		Q8VC60	Beta-galactosidase-1-like protein
		P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial
		Q9DC11	Plexin domain-containing protein 2
		P20029	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
		Q61881	DNA replication licensing factor MCM7
		O08992	Syntenin-1
		Q61826	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1
		P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
		Q9CQ60	6-phosphogluconolactonase
		P14094	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1
		P48614	Protein Wnt-10b
		O35298	Acyloxyacyl hydrolase
		P23780	Beta-galactosidase
		Q9JLT2	Trehalase
		Q05909	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma
		Q08423	Trefoil factor 1
		O35448	Lysosomal thioesterase PPT2
		P81117	Nucleobindin-2
		Q09324	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase
		Q9JHY4	WAP four-disulfide core domain protein 15B
		Q8K426	Resistin-like gamma
Sucralose	49	P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18
		Q9DBH5	Vesicular integral-membrane protein VIP36
		P30275	Creatine kinase U-type, mitochondrial
		P70663	SPARC-like protein 1
		P11588	Major urinary protein 1
		P62962	Profilin-1
		O35188	Fractalkine
		O89017	Legumain
		Q91WV7	Amino acid transporter heavy chain SLC3A1
		Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase
		P10493	Nidogen-1
		P12023	Amyloid-beta precursor protein
		B5X0G2	Major urinary protein 17
		P25119	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B
		Q80X90	Filamin-B
		Q61592	Growth arrest-specific protein 6
		Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B
		Q9JHY3	WAP four-disulfide core domain protein 12

	Q8R1U2	Cell growth regulator with EF hand domain protein 1
	P09411	Phosphoglycerate kinase 1
	Q61090	Frizzled-7
	P97808	FXYD domain-containing ion transport regulator 5
	Q9Z319	Atrial natriuretic peptide-converting enzyme
	P17182	Alpha-enolase
	Q06890	Clusterin
	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain
	P10923	Osteopontin
	P27773	Protein disulfide-isomerase A3
	Q00724	Retinol-binding protein 4
	P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic
	Q6PDN3	Myosin light chain kinase, smooth muscle
	P52480	Pyruvate kinase PKM
	O08810	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component
	P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
	P55288	Cadherin-11
	P50543	Protein S100-A11
	P45376	Aldo-keto reductase family 1 member B1
	Q9R1P3	Proteasome subunit beta type-2
	P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A
	P10853	Histone H2B type 1-F/J/L
	Q91WZ8	Dysbindin
	P00688	Pancreatic alpha-amylase 2a5
	Q02596	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1
	O88307	Sortilin-related receptor
	Q9DCG2	CD302 antigen
	Q6ZWQ0	Nesprin-2
	P04186	Complement factor B
	O70250	Phosphoglycerate mutase 2
	P35700	Peroxiredoxin-1